

Process for the microbiological production of pha-polymers

Patent Number: US5871980

Publication date: 1999-02-16

Inventor(s): NAYLOR LINDA ANNE [GB]; WOOD JOHN CHRISTOPHER [GB]

Applicant(s): MONSANTO CO [US]

Requested Patent: WO9625509

Application Number: US19970894347 19971201

Priority Number(s): GB19950003174 19950217; WO1996GB00293 19960209

IPC Classification: C12P7/62; C12P7/64; C12P7/62; C08G63/06

EC Classification: C12P7/62A

Equivalents: AU4631596, EP0809706 (WO9625509), FI973365, JP11500008T

Abstract

PCT No. PCT/GB96/00293 Sec. 371 Date Dec. 1, 1997 Sec. 102(e) Date Dec. 1, 1997 PCT Filed Feb. 9, 1996 PCT Pub. No. WO96/25509 PCT Pub. Date Aug. 22, 1996 A process for producing poly-3-hydroxyalkanoate (PHA) by culturing Alcaligenes on a low water-solubility aliphatic carboxylic acid and, or hydrolysable derivative of low solubility in pure water, by fermenting the organism in a growth step on a nutrient medium containing inter alia phosphorus in a quantity corresponding to the intended quantity of bacterial cells to be grown until cell growth stops or slows substantially, then in a PHA accumulation stage fermenting the grown cells by feeding said low-solubility carbon source while monitoring pH and adjusting it by addition of ammonia and/or alkaline alkali metal compound until a design quantity of PHA has been produced, and recovering PHA from the product. Further phosphorus may be fed to the accumulation stage at a rate sufficient to permit some bacterial growth but insufficient to permit growth to the exclusion of PHA accumulation. The over-all carbon (as C) to phosphorus (as P) weight ratio is typically in the range 40-100 in the growth stage and 300 to 600 in the accumulation stage.

Data supplied from the esp@cenet database - I2

BEST AVAILABLE COPY

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表平11-500008

(43)公表日 平成11年(1999)1月6日

(51)Int.Cl.^{*}
C 12 P 7/62
C 08 G 63/06
// (C 12 P 7/62
C 12 R 1:05)

識別記号

F I
C 12 P 7/62
C 08 G 63/06

(21)出願番号 特願平8-524742
(86) (22)出願日 平成8年(1996)2月9日
(85)翻訳文提出日 平成9年(1997)8月15日
(86)国際出願番号 PCT/GB96/00293
(87)国際公開番号 WO96/25509
(87)国際公開日 平成8年(1996)8月22日
(31)優先権主張番号 9503174.6
(32)優先日 1995年2月17日
(33)優先権主張国 イギリス(GB)

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全15頁)

(71)出願人 モンサント・カンパニー
アメリカ合衆国、ミズーリ・63167、セント・ルイス、ノース・リンドバーグ・ブルバード・800
(72)発明者 ネイラー、リンダ・アン
イギリス国、クリーブランド・ティ・エス・16・0・キュー・2、イーグルズクリフ、エイズラビー、トラフォード・ヒル、ザ・コート・ヤード・2
(74)代理人 弁理士 川口 義雄(外2名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 微生物によるPHAポリマーの生産方法

(57)【要約】

00から600までの範囲内である。

純水中での溶解度が低い低水溶性脂肪族カルボン酸及び／又は脂肪族カルボン酸に加水分解可能なその誘導体上でAlcaligenesを培養することによって、ポリ-3-ヒドロキシアルカノエート(PHA)を生産するためのプロセスであり、このプロセスは、細胞増殖が停止するか著しく減速するまで、所期の増殖細菌細胞量に対応する量のリンを特に含む栄養培地でAlcaligenesを培養する増殖段階と、その後に、pHを監視し、アンモニア及び／又はアルカリ性アルカリ金属化合物の添加によってpHを調整しながら、上記低溶解度炭素源を供給することによって、所期量のPHAが生産され終わるまで細菌細胞を培養するPHA蓄積段階と、この生産物からPHAを収集する段階とを含む。上記蓄積段階では、ある一定の細菌増殖を可能にするには十分であるがPHA蓄積の排除をもたらす増殖を可能にするには不十分な速度で追加のリンを供給することが可能である。炭素総量(C)のリン総量(P)に対する重量比は、典型的には、上記増殖段階において40から100までの範囲内であり、上記蓄積段階においては3

【特許請求の範囲】

1. 脂肪族カルボン酸及び／又は脂肪族カルボン酸に加水分解可能なその誘導体を少なくとも1つ含む炭素源上で、少なくとも1つのAlcaligenes菌株を培養することを含む、ポリ-3-ヒドロキシアルカノエート(PHA)を生産するための方法であって、前記酸、前記誘導体、又は、これらの混合物は純水中での溶解度が低く、

(a) 窒素、リン、硫黄、及び、微量元素の同化可能化合物を含み且つリンの量が所期の増殖細菌細胞量を得るための必要条件に対応する栄養培地本体を供給する段階、

(b) Alcaligenesの生菌を前記栄養培地本体に接種する段階、

(c) 増殖細菌細胞量に少なくとも対応する量の同化可能炭素化合物を前記栄養培地本体に供給する段階、

(d) pHを監視し、アンモニア及び／又はアルカリ性アルカリ金属化合物の添加によってpHを調整しながら、細胞増殖が停止するか著しく減速するまで前記接種栄養培地本体を好気培養する段階、

(e) pHを監視し、アンモニア及び／又はアルカリ性アルカリ金属化合物の添加によってpHを調整しながら、低溶解度の前記炭素源を供給することによつて、所期量のPHAが生産されるまで段階(d)の生産物を好気培養する段階、及び、

(f) 段階(e)の生産物からPHAを収集する段階を含む前記方法。

2. 前記段階(c)で供給する前記炭素化合物が前記段階(e)で使用する炭素化合物と同一である請求項1に記載の方法。

3. 前記段階(d)における炭素総量(Cとして)のリン総量(Pとして)に対する重量比が、前記化合物の化学組成に応じて様々であり、典型的には40から100までであり、特に50から80までである請求項1又は2に記載の方法。

4. 前記段階(e)において、ある一定の細菌増殖を可能にするのには十分で

あるがPHA蓄積の排除をもたらす増殖を可能にするには不十分な速度でリンを供給する請求項1から3のいずれか一項に記載の方法。

5. 前記段階(e)における炭素総量(Cとして)のリン総量(Pとして)に対する重量比が300から600までの範囲

内である請求項4に記載の方法。

6. リンの供給が培養中に定常速度であり、炭素供給に対して一定の割合である請求項4又は5に記載のプロセス。

7. 低水溶性の油性炭素源を使用する場合には、その油の活性表面積を最大化するように、好ましくは少なくとも空気吹込み攪拌と必要に応じて機械的攪拌による激しい攪拌下で前記段階(e)及び前記段階(d)を実施する請求項1から6のいずれか一項に記載の方法。

8. 前記段階(e)の終了時における細胞の乾燥重量、又は、連続操作の場合には前記段階(e)の定常状態における細胞の乾燥重量が、100g/Lから400g/Lまでの範囲内である請求項1から7のいずれか一項に記載の方法。

9. 所期PHA量が、細胞乾燥重量(PHAを含む)に対して60%w/wから80%w/wまでの範囲内のPHA含量に相当する請求項1から8のいずれか一項に記載の方法。

10. ポリヒドロキシブチレート/ポリヒドロキシバレートコポリマー(PHBV)を生産するために、前記脂肪酸(誘導体)の一部又は全部として又は前記脂肪酸に加えて奇数個の炭素原子を含む炭素源、例えば、プロピオン酸、もしくは、

n-プロピルアルコールを前記段階(e)で供給する請求項1から9のいずれか一項に記載の方法。

11. 前記Alcaligenes菌株がAlcaligenes eutrophusである請求項1から10のいずれか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

微生物によるP H A ポリマーの生産方法

本発明はポリマー生産に係わり、特に脂肪炭素源からポリ-3-ヒドロキシアルカノエート（P H A）を微生物によって生産するための方法に係わる。

E P - A - 5 2 0 4 0 5によれば、3-ヒドロキシブチレート（H B）反復単位を含むこうしたP H Aを、場合によっては窒素及びリンの制限下で、A l c a l i g e n e s l i p o l y t i c a種（F E R M B P - 3 8 1 9）に属する菌株をC₁₀-C₂₂脂肪酸又はその誘導体上で培養することによって生産することが可能である。しかし、他のA l c a l i g e n e s（特に、A. e u t r o p h u s及びA. l a t u s）は、上記のような供給原料上での増殖が不可能であるか、又は、増殖が可能な場合であっても極めて緩慢な増殖しか得られないということが報告されている。

E g g i n k他（I n d u s t r i a l C r o p s a n d P r o d u c t s 1 9 9 3 , 1 , 1 5 7 - 1 6 3 ）によれば、こうしたP H Aを、オレイン酸上でA. e u t r o p h u sを培養することによって生産することが可能であり、P H

Aの収量は窒素制限下で更に多くなる。

本出願人は、現在、炭素源としての脂肪族カルボン酸又は脂肪族カルボン酸に加水分解可能な誘導体から、A l c a l i g e n e sが高い収率及び／又は生産率でP H Aを生産する培養条件を発見した。

本発明によるP H A生産方法は、脂肪族カルボン酸及び／又は脂肪族カルボン酸に加水分解可能なその誘導体を少なくとも1つ含む炭素源上で、少なくとも1つのA l c a l i g e n e s菌株を培養することを含み、こうした酸、誘導体、又は、これらの混合物は純水中での溶解度が低い。この方法は、

- (a) 窒素、リン、硫黄、及び、微量元素の同化可能化合物を含み且つリンの量が所期の増殖細菌細胞量の必要条件に対応する栄養培地本体を供給する段階、
- (b) A l c a l i g e n e sの生菌を上記栄養培地本体に接種する段階、
- (c) 増殖細菌細胞量に少なくとも対応する量の同化可能炭素化合物を上記栄

養培地本体中に供給する段階、

(d) pHを監視し、アンモニア及び／又はアルカリ性アルカリ金属化合物の添加によってpHを調整しながら、細胞増殖

が停止するか著しく減速するまで接種栄養培地本体を好気培養（発酵）する段階

(e) pHを監視し、アンモニア及び／又はアルカリ性アルカリ金属化合物の添加によってpHを調整しながら、低溶解度の上記炭素源を供給することによって、所期量のPHAが生産され終わるまで段階(d)の生産物を好気培養（発酵）する段階、及び、

(f) 段階(e)の生産物からPHAを収集する段階
を含む。

段階(c)で供給される炭素化合物は、Alcaligenesが同化可能なあらゆる炭素化合物であり得る。例えば、こうした炭素化合物は、糖、糖アルコール、糖酸、アルカノール、又は、アルカン酸であることが可能である。この炭素化合物は脂肪酸又は脂肪酸に加水分解可能な誘導体であると都合がよく、段階(e)でも同様の炭素化合物を使用する。

段階(d)では、段階(a)で供給したリンが（典型的には、上清液1L当たりリン10mg未満に）消費され終わった時に、細胞増殖が停止するか又は著しく減速する。好気培養のための酸素供給が過剰になることを回避し且つ（場合に応じて）炭素

化合物の濃度が毒性をもたらす濃度になることを回避するように、同化可能な炭素化合物を徐々に供給することが一般的である。この段階における炭素総量(Cとして)のリン総量(Pとして)に対する重量比は、該化合物の化学的組成に応じて、典型的には40から1000まで、特に50から80までの範囲内である。

段階(e)、及び、場合によっては段階(c)では、それ自体として使用されようが加水分解可能誘導体として使用されようが脂肪酸は、外界温度の純水中に

において、3%w/w未満の溶解度を有することが好ましく、1%w/w未満の溶解度を有することが特に好ましい。典型的には、この脂肪酸は、8個から25個までの炭素原子、特に10個から22個までの炭素原子を含むアルキル基を1つ以上含む。上記誘導体がエステルであることが好ましく、トリグリセリドであることが適切であり、天然トリグリセリドであることが特に適している。脂肪酸は、（段階（d）及び（e）の温度より高い融点を持たない限り）飽和脂肪酸であってよく、又は、モノ不飽和脂肪酸もしくはポリ不飽和脂肪酸であってもよい。トリグリセリドの例は、動物産物（例えば、バター、鯨油、牛脂、豚脂、羊脂、魚油）、及

び、植物油（例えば、オリーブ油、トウモロコシ油、ナタネ油、ヒマシ油、大豆油、ヒマワリ油、亜麻仁油）である。抽出した不飽和油を部分的に又は完全に水素化することが可能である。こうしたトリグリセリドは人間用食品グレードにまで精製する必要はないと考えられる。許容できる又は生産過程で同化される不純物の中には、対応する脂肪酸、リン脂質、着色材料の微量成分（例えば、微量金属化合物、及び、クロロフィル）が含まれる。別のエステル又は追加のエステルとしては、モノグリセリド、ジグリセリド、又は、脂肪酸のモノエステル誘導体（例えば、「バイオディーゼル（bio-diesel）」として使用することが提案されているメチルエステル）を使用することが可能である。特に炭素源が上記培養温度で溶融する材料を含む場合には、こうした誘導体の混合物を使用することが可能である。

脂肪酸が偶数個の炭素原子を含み且つ段階（e）で唯一の炭素源である場合には、生産物であるPHAは実質的に又は完全にポリヒドロキシブチレート（PHB）ホモポリマーである。ポリヒドロキシブチレート／ポリヒドロキシバレートコポリマー（PHBV）が必要とされる場合には、奇数個の炭素原子を含む炭素源を使用しなければならない。これは、脂

肪酸（誘導体）の一部又は全部であってもよく、又は、脂肪酸に対して追加してもよく、かかる炭素源は、例えば、プロピオン酸、もしくは、n-プロピルアル

コールである。生産物であるP H Aは、30 mol%以下のV、特に3 mol%から25 mol%までのVを含み、残部がBであることが好ましい。

本発明のプロセスは、あらゆる種又は菌株のA l c a l i g e n e sを使用することが可能である。特定の例は、A. eutrophus、A. latus、A. faecalis、A. ruhlandii、A. aquamarinus、及び、A. lipolyticaである。本発明のプロセスの特に大きな利点は、A. lipolytica以外の細菌が、脂肪酸エステルをP H Aに変換することが可能な唯一の細菌であると本発明以前には考えられてきたA. lipolyticaと少なくとも同じ活性と効率とを有すると思われるということである。

段階(e)の終了時における細胞の乾燥重量、又は、(連続操作の場合における)段階(e)の定常状態における細胞の乾燥重量が、100 g/Lから400 g/Lの範囲内であることが好ましい。所期P H A量が、細胞乾燥重量(P H Aを含む)に対して60%w/wから80%w/wまでの範囲内のP H A

含量に相当することが好ましい。

本発明のプロセスの好ましい形態では、段階(e)において、ある一定の細菌増殖を可能にするのには十分であるが最大増殖(即ち、P H A蓄積の排除をもたらす増殖、又は、蓄積に伴う最大可能レベルに達する増殖)を可能にするには不十分な速度でリンを供給する。(後者は、増殖と蓄積が同時に可能なA l c a l i g e n e s種に適用する)。典型的には、段階(c)では、供給される炭素総量(Cとして)のリン総量(Pとして)に対する重量比は、300から600までの範囲内である。これは、P H A含有細胞の個数の増大と細胞の高P H A含量とによって、供給バッチ培養における高いP H A生産高をもたらすばかりでなく、より速い反応と高いプロピオン酸効率ももたらすと考えられる。(好都合にはリン酸塩としての)リンの供給は培養中は定常速度で行われ、且つ、好ましくは炭素供給に対して一定の割合である。

段階(e)では、炭素源と(場合に応じて)上記リン化合物とに加えて、段階(d)の後に存在する他の必須栄養素(例えば、窒素、硫黄、微量元素)を補充

するために、こうした必須栄養素を供給することも可能である。

段階 (e) 及び段階 (d) では、低水溶性の油性炭素源を使用する場合に、その油の活性表面積を最大化するように、少なくとも空気吹込み攪拌と必要に応じて機械的攪拌とによる激しい攪拌を伴う形でこれらの段階を行う。

増殖段階 (d) 及び蓄積段階 (e) における pH は、最も迅速な反応が得られる値の pH 単位の半分以内に保たれることができほしい。典型的には、培養温度のブイヨン中で測定する場合に、pH は 6.0 から 7.5 までの範囲内である。ガラス電極による pH 測定に応答する形で自動的にアンモニア水又はアルカリ性アルカリ金属化合物の添加を行うことが適切である。

段階 (d) と段階 (e) の温度は、Alcaligenes と水溶性炭素源とを使用する場合に、例えば 20°C から 40°C までの範囲内であり、特に 28°C から 38°C までの範囲内である。

生産物である PHA は R 立体特異性であり、典型的には 3-ヒドロキシブチレート反復単位だけから成る (「PHB」) か、又は、3-ヒドロキシブチレート単位と (3 mol % 以下、特に 3 mol % から 25 mol % までの) 3-ヒドロキシバレート単位とから成る (「PHBV」)。この PHA の分子量

は例えば 50000 以上であり、特に 100000 以上であり、例えば 2×10^6 までである。

段階 (f) での PHA の収集は、任意の適切な方法で行うことが可能である。一般的な方法の 1 つでは、PHA を含む細胞を遠心分離によって培養液から分離し、細胞を物理的又は化学的に破壊し、PHA をハロゲン化炭化水素又は炭酸アルキレンのような溶媒中で抽出する。別の方では、機械的作用、熱処理、酵素処理、界面活性剤処理、及び、酸化の中の幾つかの処理を行うことによって、又は、これら全てを行うことによって、非 PHA 細胞材料を可溶化し、PHA 粒子を細胞中に残すか、PHA 粒子の凝集体を生じさせる。こうした粒子又は凝集体を、溶融処理又は溶媒処理に使用するために乾燥状態で収集し、又は、コーティング剤もしくは接着剤として使用するために、もしくは、乾燥 PHA へ後で変換

するために、ラテックスとして収集することが可能である。

下記の実施例は、同様のV含量(6.9 mol%から8.7 mol%までの範囲内)を有するPHBVの生産を説明する。

実施例1

空気吹込み攪拌のできる容積15Lの実験用培養槽の中に、

1L当たり

ナタネ油	3.00g
濃H ₃ PO ₄ (400mg/LのP)	0.93mL
MgSO ₄ ·7H ₂ O	2.18g
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.81g
K ₂ SO ₄	2.18g
酢酸カルシウム	0.36g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.14g
Na ₂ SO ₄	0.09g
MnSO ₄ ·H ₂ O	0.04g
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.09g
CuSO ₄ ·5H ₂ O	4.50mg

を含む培地8Lを入れた。7M NH₄OHを添加することによってpHを6.8に調節し、温度を34℃に維持した。

その後で、Alcaligenes eutrophus (NCIMB 40124) の培養液200mL(生菌0.2g)を攪拌しながら加えた。絶対圧力1バールで空気飽和の

10%を越える値に溶解酸素圧力を維持するように空気の流量を調整した。1時間当たり非PHA細胞質量1g当たり0.13gまでの平均油取り速度を得るように更に追加のナタネ油を供給した。

20時間後に、油取り速度が著しく低下し、リンの実質的な消耗を示したことを見認めた。この時点では、供給炭素総量(Cとして)の供給リン総量(Pと

して)に対する重量比は60だった。その後で、これらの炭素源の取込み速度が低下して、PHAへの変換が実質的に停止するまで、ナタネ油とプロピオニ酸を供給した。

その結果得られたバイオマスを標本として採取し、細胞乾燥重量、PHA含量、及び、PHAバレレート含量を分析した。

実施例2

細胞乾燥重量を所期レベルに増加させるのに十分ではあるがPHA蓄積の抑制を伴う実質的な増殖を生じさせるには不十分である400から600までの範囲内にC/P比を維持しながら、使用したリン総量の17%まで、PHA蓄積段階中にリン酸をナタネ油と共に培養槽に供給したという変更点を除いて、実施例1の手順と同様の手順を繰り返した。

実施例3

炭素源として粗トウモロコシ油を使用したという変更点を除いて、実施例1の手順と同様の手順を繰り返した。

結果

典型的な処理で得られた最終細胞乾燥重量、PHA収量、及び、PHA分子量を、次の表1に示す。

表1

実施例 (V mol %)	最終細胞 乾燥重量 (g/l)	乾燥細胞 中のPHA (%)	使用した油 1g当たりの PHA量(g)	PHA質量 (g)	処理時間 (時間)	プロピオネート 効率 (mol %)
1(7.4)	140	64	0.63	1038	80	11.2
2(8.7)	204	67	0.63	1728	65	18.2
3(6.9)	162	72	0.69	1289	65	24.0

炭素源としてナタネ油又はトウモロコシ油を使用した場合に、Alicaligenes eutrophusが活発に増殖し、PHAを高効率で蓄積すること

が明らかである。P H A 蓄積中のリン酸塩の供給は、P H A 生産速度と、プロピオン酸がP H A 中のバレレート反復単位に変換される効率とを効果的に増大

させる。粗トウモロコシ油の使用によって、プロピオネット効率の更なる改善が得られる。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

		b International Application No PCT/GB 96/00293
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 6 C12P7/62 // (C12P7/62, C12R1:05)		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 C12P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP,A,0 520 405 (ASAHI KASEI KOGYO KABUSHIKI KAISHA) 30 December 1992 cited in the application see p. 3, 10 and claim 1 ---	1-11
X	DATABASE WPI Week 9043 Derwent Publications Ltd., London, GB; AN 90-325620 XP002003618 "Preparation of polyester biopolymer - containing units of 3- and 4-hydroxy-butyrate obtained by culturing bacterial strain of alcaligenes" & JP,A,02 234 683 (MITSUBISHI KASEI CORP) . 17 September 1990 see abstract --- -/-	1-11
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.
* Special categories of cited documents :		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance		
"B" earlier document but published on or after the international filing date		
"C" document which may throw doubt on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another claim or other special reason (as specified)		
"D" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		
"E" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
"F" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention		
"G" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone		
"H" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.		
"I" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
23 May 1996	07.06.96	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 3818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016	Authorized officer Douschan, K	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

L International Application No
PCT/GB 96/00293

C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT	
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages Relevant to claim No.
X	APPL. MICROBIOL. BIOTECHNOL., vol. 31, 1989, pages 168-175, XP002003615 STEINBÜCHEL A. UND SCHLEGEL H.G.: "Excretion of pyruvate by mutants of Alcaligenes eutrophus" see especially the summary ---
Y	INDUSTRIAL CROPS AND PRODUCTS, no. 1, 1993. pages 157-163. XP002003616 EGGINIK G. ET AL: "Oleic acid as a substrate for poly-3-hydroxyalcanoate formation in Alcaligenes eutrophus and Pseudomonas putida" cited in the application see the whole article ---
Y	J. FERM. BIOENG., vol. 74, no. 5, 1992, pages 288-291, XP002003617 KENJI TANAKA ET AL: "Accumulation of Polyphosphate and Substrate Gas Utilization Efficiency in PHB Accumulation Phase of Autrophic Batch Culture of Alcaligenes eutrophus ATCC17697" see the whole article -----

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

h ~~among~~ Application No
PCT/GB 96/00293

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
EP-A-0520405	30-12-92	JP-A-	5064592	19-03-93

フロントページの続き

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, DE,
DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, M
C, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG
, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN,
TD, TG), AP(KE, LS, MW, SD, SZ, U
G), UA(AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM
, AL, AM, AT, AU, AZ, BB, BG, BR
, BY, CA, CH, CN, CZ, DE, DK, EE,
ES, FI, GB, GE, HU, IS, JP, KE, K
G, KP, KR, KZ, LK, LR, LS, LT, LU
, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO,
NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, S
I, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US
, UZ, VN

(72)発明者 ウツド, ジヨン・クリストファー
イギリス国、カウンティ・ダーラム・エ
ス・アール・8・1・エヌ・キュー、ピー
ターリー、オーカーサイド・パーク、バー
ウイツク・チエイス・58

THIS PAGE BLANK (USPTO)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)